

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 543.544.546.299

О.М. Журба, А.Н. Алексеенко

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТИОДИГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ У РАБОТНИКОВ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА

Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)

Разработана и аттестована методика определения тиодигликолевой кислоты в моче методом газожидкостной хроматографии на капиллярной колонке HP-5 с пламенно-ионизационным детектированием. Выбраны оптимальные условия хроматографирования; оптимизированы условия пробоподготовки путём использования химической дериватизации метанолом с последующей жидкостно-жидкостной микроэкстракцией; проведены метрологические исследования. В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), снабжённым автодозатором Agilent 7693, позволяющим регулировать глубину погружения иглы хроматографического шприца в вials. Управление работой хроматографа и автодозатора, а также сбор и обработка хроматограмм осуществляется программой GC ChemStation. Для приготовления модельных растворов и подготовки проб применяли следующие реактивы и материалы: тиодигликолевая кислота (98 %, Aldrich), диметиловый эфир ТДГК, этилацетат (о.с.ч.), метанол (о.с.ч.), серная кислота (х.ч.), сульфат натрия (х.ч.), вода дистиллированная, образцы мочи, которые не содержат ТДГК. Подготовка пробы включает дериватизацию метанолом в присутствии серной кислоты, жидкостно-жидкостную микроэкстракцию диметилового эфира ТДГК этилацетатом и центрифугирование. Идентификацию на хроматограмме диметилового эфира ТДГК проводили по абсолютному времени удерживания, которое в свою очередь контролировали сравнением и наложением полученных хроматограмм с двумя хроматограммами модельных смесей ТДГК в моче разной концентрации, а также с хроматограммой модельной смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате. Получение градуировочной характеристики проводили по пяти модельным растворам ТДГК в воде. Диапазон определяемых концентраций в моче 0,4–90 мкг/см³, внутрिलाбораторная прецизионность S_r 0,065, точность ($P = 0,95$) 15 %. Изучено содержание тиодигликолевой кислоты у работников основных цехов производства поливинилхлорида. Установлено, что содержание данного метаболита зависит от длительности и дозы воздействия. Наибольшие значения концентраций ТДГК в моче характерны работникам цеха по получению винилхлорида из 1,2-дихлорэтана.

Ключевые слова: винилхлорид, производство поливинилхлорида, тиодигликолевая кислота в моче, газожидкостная хроматография

GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF THIODIGLYCOLIC ACID CONTENTS IN URINE OF POLYVINYL CHLORIDE PRODUCTION WORKERS

О.М. Zhurba, A.N. Alexeenko

Institute of Occupational Health & Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk

The method of determination of the thiodiglycolic acid (TDGA) in urine using gas-liquid chromatography on the capillary column HP-5 with the flame ionization detection was developed and certified. Optimal conditions for chromatography were chosen: the conditions for preparing the samples with use of chemical derivatization by methanol followed by the liquid – liquid microextraction were optimized; the metrological studies were performed. We used gas chromatograph AGILENT 7890A with flame-ionization detector (FID) equipped with autosampler AGILENT 7693 which allows to regulate the depth of chromatographis springe needle immersion into the vial. The control of the chromatograph and the autosampler functions as well as the collection and processing of the chromatograms are realized by the software programme GC ChemStation. Following reagents and materials were used to prepare the samples and model solutions: thiodiglycolic acid (TDGA) (98 % Aldrich), dimethyl ether of TDGA, ethyl acetate (extra pure), methanol (e.p.), sulfuric acid (chemically pure), natrium sulfate (chemically pure), distilled water, urine samples free of TDGA. Preparation of the sample includes derivatization with methanol in the presence of sulfuric acid as well as the liquid – liquid microextraction of the TDGA dimethyl ether with ethyl acetate and centrifuging. The identification of TDGA dimethyl ether on the chromatogram was realized with use of absolute time of retaining that was controlled by the comparison and imposing of received chromatograms with two chromatograms of model TDGA mixtures in the urine of different concentrations as well as with the chromatogram of model mixture of TDGA dimethyl ether in ethyl acetate. The calibration curve was received with use of five model TDGA solutions in water. The range of the concentrations determined in the urine was 0,4–90 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, the interlaboratory precision S_r was 0,065 and the accuracy ($P = 0.95$) was 15 %. The thiodiglycolic acid contents was studied in the employees of the main departments of the polyvinyl chloride production. It was found that content of this metabolite may depend on the duration and the dose of exposure. The highest concentrations of TDGA in the urine are typical for the departments of production of vinyl chloride from 1,2-dichloroethane.

Key words: vinyl chloride, industry of polyvinyl chloride, thiodiglycolic acid in urine, gas-liquid chromatography

Крупным производителем поливинилхлорида (ПВХ) в России является ОАО «Саянскхимпласт», который обеспечивает до 40 % общего объема его выработки, и входит в число 200 крупнейших компаний страны. Винилхлорид является одним из основных хлорорганических соединений в воздухе рабочей зоны производства ПВХ и характеризуется преобладанием поражения нервной системы и паренхиматозных органов, гемодинамическими расстройствами, канцерогенезом [1, 2, 3].

Наиболее распространённая характеристика производственной среды, как правило, даётся путём измерения концентраций веществ в воздухе рабочей зоны. Однако определение химических соединений в воздухе рабочей зоне показывает их концентрации только в конкретное время и на конкретном месте. Более точная информация получается при постоянной регистрации концентраций в воздухе или при использовании индивидуальной дозиметрии. Однако эти методы не дают исчерпывающего представления о количестве токсического вещества, абсорбированного в организм экспонированных лиц, особенно в тех случаях, когда существует возможность поступления вещества другими путями (кожный, оральный). Указанный недостаток можно корректировать применением экспозиционных тестов, а именно определением содержания метаболитов токсичных веществ в биологических матрицах (в моче) человека [4].

Одним из конечных метаболитов винилхлорида в процессе его биотрансформации в организме является тиодигликолевая кислота (ТДГК). Доказано, что именно ТДГК является биомаркером воздействия винилхлорида, так как данный токсикант вызывает экскрецию тиодигликолевой кислоты в мочу, которая у животных составляет 50 % от всех метаболитов [5].

Одним из перспективных методов определения метаболитов токсичных органических соединений является газожидкостная хроматография (ГЖХ), которая применяется в качестве базового метода в большинстве лабораторий, специализирующихся в области аналитической токсикологии. Газохроматографическое определение ТДГК, содержащей в своей молекуле две карбоксильные группы с активными атомами водорода, требует обязательной дериватизации, т.е. получения её летучих производных. Отечественные работы по определению ТДГК в моче отсутствуют. Зарубежные методики определения ТДГК в моче обладают следующими недостатками: использование в качестве дериватизирующего реагента очень канцерогенного и взрывоопасного диазометана; низкие степени извлечения в процессе пробоподготовки, что в свою очередь сказывается на чувствительности определения ТДГК, большие расходы особо чистых органических растворителей [6, 7, 8, 9].

Цель работы заключалась в разработке новой газохроматографической методики определения ТДГК в моче с пламенно-ионизационным детектированием. В ходе исследования решены следующие задачи: выбраны оптимальные условия

хроматографирования; оптимизированы условия пробоподготовки путём использования химической дериватизации метанолом с последующей жидкостно-жидкостной микроэкстракцией; проведены метрологические исследования; изучены содержания тиодигликолевой кислоты в моче у работников производства поливинилхлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), снабжённым автодозатором Agilent 7693, позволяющим регулировать глубину погружения иглы хроматографического шприца в вialу. Управление работой хроматографа и автодозатора, а также сбор и обработка хроматограмм осуществляется программой GC ChemStation. Для приготовления модельных растворов и подготовки проб применяли следующие реактивы и материалы: тиодигликолевая кислота (98 %, Aldrich), диметиловый эфир ТДГК, этилацетат (о.с.ч.), метанол (о.с.ч.), серная кислота (х.ч.), сульфат натрия (х.ч.), вода дистиллированная, образцы мочи, которые не содержат ТДГК.

В стеклянную вialу объемом 1,5 см³ помещали 0,1 см³ образца, 0,02 см³ концентрированной серной кислоты, 0,1 см³ метанола. Закрыв пластмассовой закручивающейся крышкой с септой, выдерживали в термостате при 80 °С. По истечении 15 мин вialу вынимали из термостата, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,5 см³ этилацетата и 0,9 см³ водного раствора сульфата натрия. Затем проводили встряхивание на мульти-вортексе в течение 5 мин с последующим центрифугированием при 3000 об./мин в течение 5 мин. После разделения фаз вialу помещали в автодозатор, который отбирал 2 мкл верхнего слоя из органической фазы и вводил в испаритель газового хроматографа. Перенос образца с испарителя в колонку осуществляли в режиме «splitless», а хроматографирование — в режиме температурного программирования (табл. 1). Идентификацию на хроматограмме диметилового эфира ТДГК проводили по абсолютному времени удерживания, которое в свою очередь контролировали сравнением и наложением полученных хроматограмм с двумя хроматограммами модельных смесей ТДГК в моче разной концентрации, а также с хроматограммой модельной смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате. Получение градуировочной характеристики проводили по пяти модельным растворам ТДГК в воде в диапазоне 0,4 — 90,0 мкг/см³.

Результаты исследований представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q25 — Q75), нормальность распределения признаков определяли с помощью теста Шапиро — Уилка с использованием пакета прикладных программ «Statistica 5.5».

Исследования выполнены с информированного согласия обследуемых лиц и соответствуют этическим нормам Хельсинской декларации, требованиям приказа МЗ РФ № 266 от 19.06.2003 г.

Условия газохроматографического анализа для определения ТДГК

Условия	Значения
Колонка	НР-5 30 м × 320 мкм, толщина фазы 0,25 мкм
Газ-носитель	Азот, 2 см ³ /мин
Температурный режим термостата колонок	Программирование, 80 °С с выдержкой 1 мин, подъём со скоростью 5 °С/мин до 130 °С
Кондиционирование колонки после анализа	Температура термостата колонки 240 °С в течение 6 мин, объёмная скорость потока газа-носителя через колонку 4 см ³ /мин
Температура инъекционного порта	250 °С
Режим переноса образца в колонку	Splitless 0,3 мин, 40 см ³ /мин
Режим пламенно-ионизационного детектора	300 °С, скорость потока водорода 30 см ³ /мин, воздуха – 250 см ³ /мин, поддува азота – 25 см ³ /мин

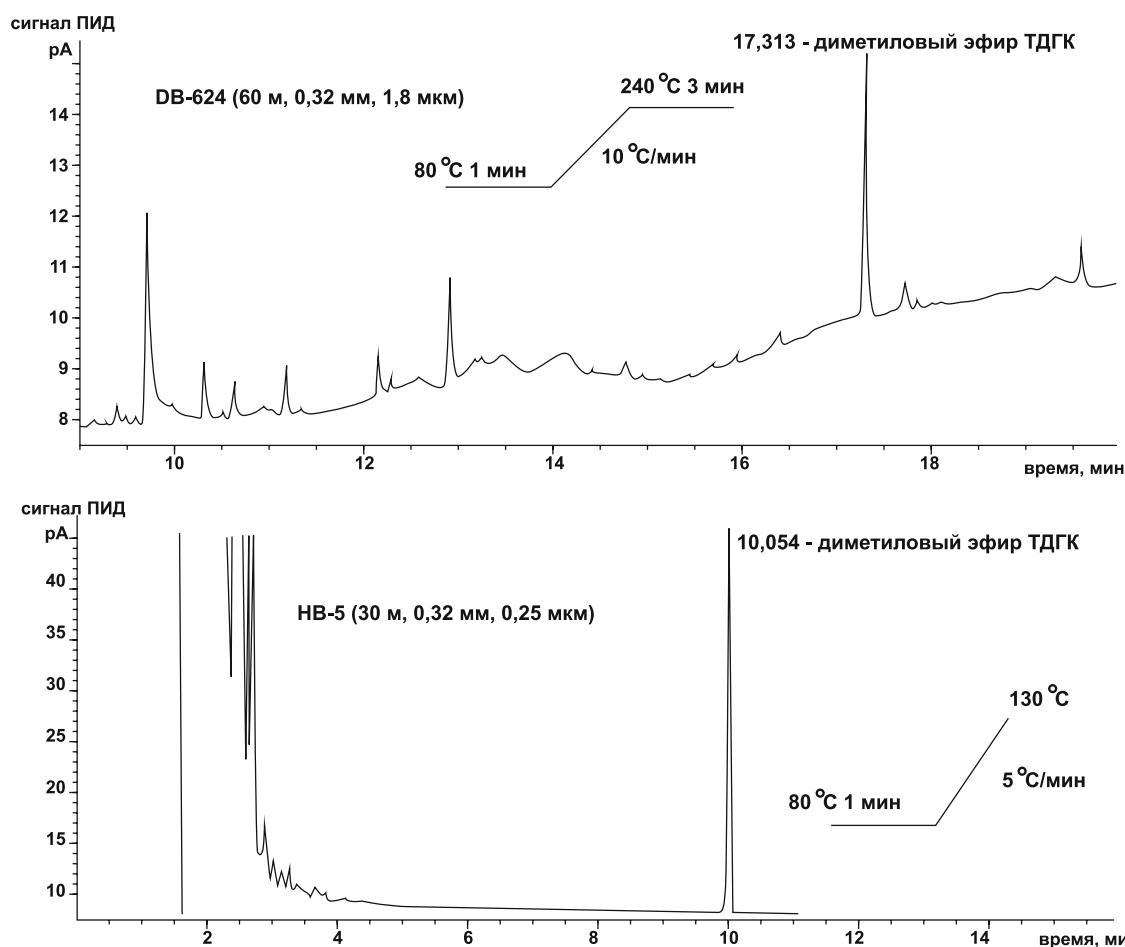


Рис. 1. Хроматограммы смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате на двух капиллярных колонках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных условий хроматографирования осуществляли на стандартной смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате на двух капиллярных колонках разной длины и полярности. Установлено, что именно в условиях градиента температуры и в режиме введения образца в колонку «splitless» достигаются оптимальные разделение компонентов смеси и чувствительность определения (рис. 1).

При сравнении хроматографических параметров, полученных на колонках НР-5 и DB-624, видно, что максимальные коэффициент удерживания,

эффективность, минимальные ширина пика на полувысоте и ВЭТТ достигаются на колонке DB-624 (табл. 2). Но при этом продолжительность анализа на колонке НР-5 в 1,6 раз меньше продолжительности анализа на колонке DB-624.

Высокая эффективность колонки DB-624 и большое время анализа объясняются её длиной и толщиной плёнки НЖФ, превышающими длину колонки НР-5 в 2 раза и толщину плёнки НЖФ в 7 раз, а также более высокой полярностью колонки DB-624 из-за наличия в НЖФ функциональных групп $(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{N}$. Если сравнить хроматограммы, полученные на колонке DB-624, с хроматограмма-

Основные хроматографические параметры диметилового эфира ТДГК

Параметр	Значения на двух колонках	
	DB-624	HP-5
Время удерживания, мин	17,3	10
Полуширина пика, мин	0,04	0,05
Коэффициент удерживания	4,2	6,1
Эффективность колонки, т.т. на метр	17000	5600
ВЭТТ, мм	0,06	0,18
Асимметрия	1	1

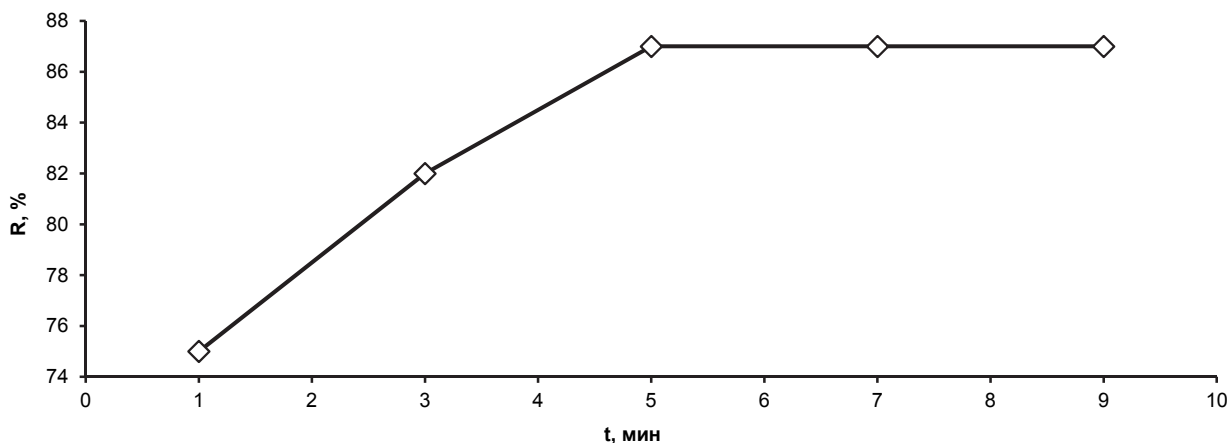


Рис. 2. Зависимость степени экстракции (R) от времени (t).

ми, полученными на колонке HP-5, видна следующая картина: при программировании температуры происходит подъём базовой линии за счёт постепенного уноса жидкой фазы из колонки DB-624. Данный температурный режим на колонке DB-624 в дальнейшем будет приводить к ухудшению эффективности. Таким образом, газохроматографическое определение ТДГК в виде её более летучего производного (диметилового эфира) целесообразнее осуществлять на колонке HP-5.

Выбор оптимальных условий подготовки проб сводился к выбору различных факторов: соотношения объёмов пробы, метанола, серной кислоты; температуры и продолжительности дериватизации; органического экстрагента; соотношения объёмов водной и органической фазы; продолжительности экстракции. Для совмещения стадий пробоподготовки — дериватизации и экстракции в одной ёмкости с минимальным расходом органических растворителей решили использовать хроматографическую виалу на 1,5 см³, снабжённую закручивающейся крышкой с септой. С учётом объёма виалы эмпирически выбраны объёмы водной фазы и органической фазы (экстрагента), которые составляют 1 и 0,5 мл соответственно. В качестве экстрагента выбран этилацетат, который очень хорошо экстрагирует эфиры. Соотношение объёмов пробы, метанола и серной кислоты (0,1 : 0,1 : 0,02) вызвано тем, чтобы этерификация метанолом в присутствии катализатора серной кислоты протекала количе-

ственно и необратимо. Для экспериментальной оценки степени экстракции проводили анализ образца мочи (0,1 см³), в которую вводили добавку 12,6 мкг деривата — диметилового эфира, 0,02 см³ серной кислоты, 0,5 см³ этилацетата, 0,9 см³ водного раствора сульфата натрия (0,18 г/см³). Затем проводили встряхивание на мульти-вортексе при разной продолжительности (1 — 9 мин). В результате получена зависимость степени экстракции от времени встряхивания (рис. 2). Сходимость измерения степени экстракции характеризуется коэффициентом вариации 6 %. Как видно из зависимости, степень экстракции возрастает до максимального значения 87 % в течение 5 мин, а затем остаётся неизменной. Поэтому оптимальной продолжительностью экстракции является проведение встряхивания на мульти-вортексе в течение 5 мин.

Для выбора оптимальных условий времени и температуры реакции этерификации (дериватизации), а именно времени и температуры исследована зависимость степени дериватизации от температуры и продолжительности реакции на модельном растворе ТДГК в моче с концентрацией 45 мкг/см³. Этерификацию проводили при разных температурах (60 и 80 °С) и разной продолжительности нагревания (5 — 60 мин). По результатам расчётов построены зависимости степени дериватизации от времени при двух температурах (рис. 3).

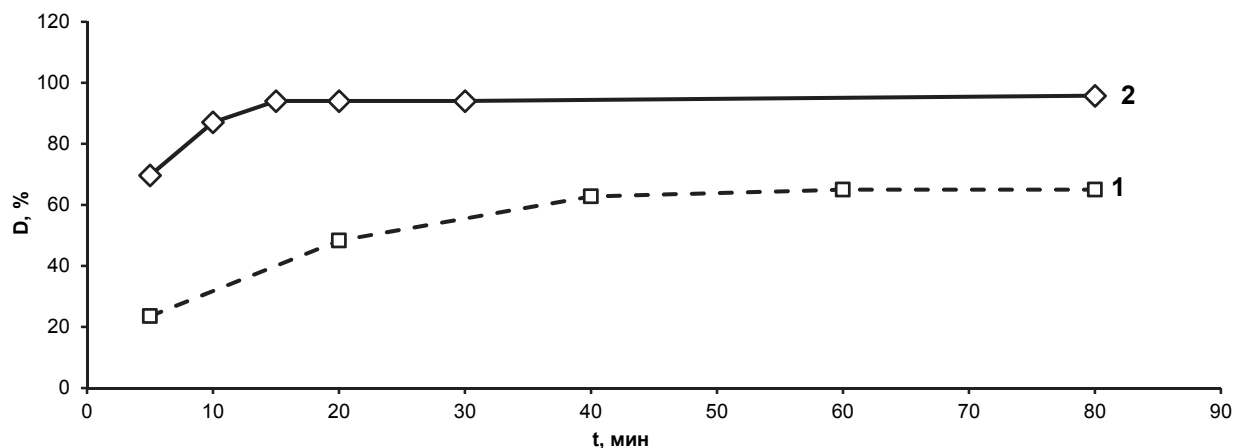


Рис. 3. Зависимости степени дериватизации (D) ТДГК от времени нагревания (t) при температурах 60 °C (1) и 80 °C (2).

Таблица 3

Метрологические характеристики

Определяемое вещество	Диапазон концентраций, мкг/см ³	ОСКО повторяемости V _r , %	ОСКО внутрилабораторной прецизионности V _{RL} , %	Показатель точности – границы относительной погрешности* δ _л , %
ТДГК	0,5–2,0	4	6	14
	0,4–1	9	6,5	15

Примечание: * – соответствует относительной расширенной неопределенности U_{отн.} при k = 2.

Таблица 4

Размах содержания тиодигликолевой кислоты в моче

Группы	min–max, мкг/см ³	Me (Q ₂₅ –Q ₇₅)
Цех № 30 (n = 15)	0,4–5,0	0,98 (0,52–1,73)
Цех № 40 (n = 15)	0,24–2,7	0,6 (0,4–1,5)
Контрольная группа (n = 25)	0,4–3,08	0,6 (0,4–1,1)

Как показывают зависимости, с повышением температуры и времени нагревания степень дериватизации возрастает. Поэтому оптимальным условием дериватизации является проведение реакции этерификации ТДГК метанолом в присутствии серной кислоты при температуре 80 °C не менее 15 мин. Сходимость определения степени дериватизации характеризуется коэффициентом вариации 4 %.

Оценены метрологические характеристики методики: повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, правильность, точность в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725 (табл. 3).

Оценивание проводили по экспериментальным данным газохроматографического анализа аттестованных смесей (АС) ТДГК в моче. По результатам метрологической оценки получено свидетельство об аттестации методики.

Содержание ТДГК определяли в пробах суточной мочи лиц, находящихся в условиях стационара в 2010 году. Данные лица (всего 39 человек) являются работниками основных цехов производства винилхлорида и смолы поливинилхлорида ОАО «Саянскхимпласт». Основные цеха производства поливинилхлорида – это цех по получению ви-

нилхлорида из 1,2-дихлорэтана (цех № 30, 15 человек) и цех по получению смолы поливинилхлорида из винилхлорида (цех № 40, 24 человека). Также были проанализированы пробы мочи лиц контрольной группы – здоровых людей, не работающих на химических производствах, 25 человек (табл. 4).

Наибольшие концентрации ТДГК в моче отмечены у работников цеха № 30, меньшие – у работников цеха № 40. Вероятно, это связано с более высокой дозой воздействия хлорорганических соединений или длительности контакта. Также установлено, что содержание ТДГК в моче с увеличением времени отбора пробы уменьшается (рис. 4). Это говорит о том, что ТДГК постепенно выводится из организма.

Полученные результаты не противоречат литературным данным. Литературные данные о содержании тиодигликолевой кислоты в моче рабочих производства винилхлорида, в зависимости от содержания винилхлорида в воздухе рабочей зоны, приведены в работах [9, 10]. Концентрации ТДГК в моче составляют 1,0 – 2,0 мкг/см³ при содержании ВХ в производственной среде менее 5,0 мг/м³, при

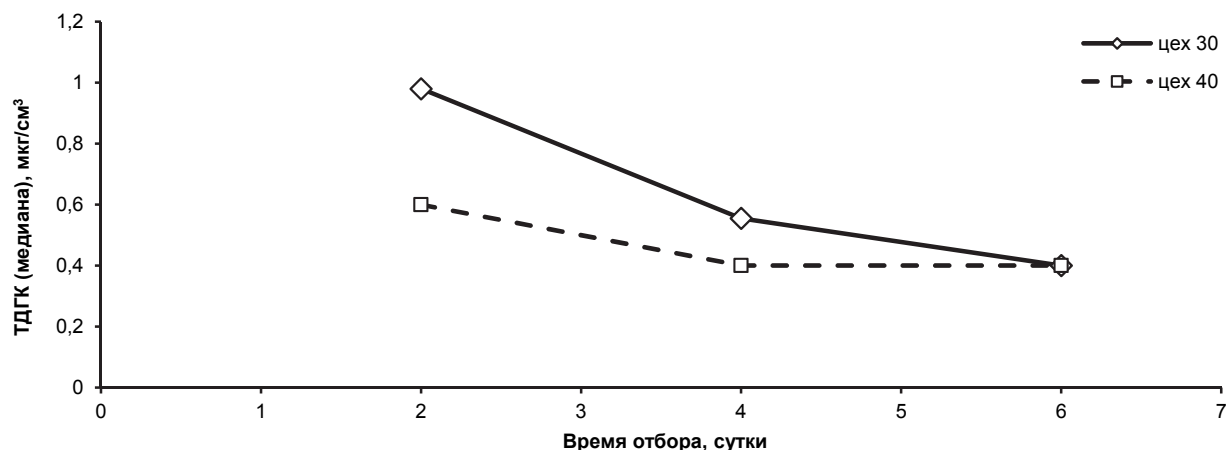


Рис. 4. Зависимости содержания ТДГК в моче от времени отбора пробы в момент поступления в стационар клиники.

содержании ВХ на уровне $5,0 \text{ мг/м}^3$ концентрация ТДГК составляет $2,5 \text{ мкг/см}^3$, при концентрациях ВХ выше $5,0 \text{ мг/м}^3$ концентрации ТДГК составляют $3,5\text{--}6,0 \text{ мкг/см}^3$.

В результате апробации разработанной методики получены значения содержания тиодигликолевой кислоты в моче у работников производства поливинилхлорида (ОАО «Саянскхимпласт»). Установлено, что содержание данного метаболита зависит от длительности и дозы воздействия. Наибольшие значения концентраций ТДГК в моче характерны для работников цеха по получению винилхлорида из 1,2-дихлорэтана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорогова В.Б., Мещак Н.М., Журба О.М. Оценка производств винилхлорида и поливинилхлорида как источников загрязнения воздушной среды рабочих помещений и их влияние на организм работающих (обзор литературы) // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2008. — № 1. — С. 83–88.
2. Лемешевская Е.П., Жукова Е.В. Вопросы гигиены труда в крупнотоннажном производстве поливинилхлорида // Мед. труда и пром. экология. — 1995. — № 6. — С. 17–20.
3. Антонюженко В.А. Винилхлоридная болезнь — углеводородный нейротоксикоз. — Горький: Волго-Вятское кн. изд-во, 1980. — 183 с.
4. Орлова О.И., Савельева Е.И., Радилов А.С., Бабаков В.Н. и др. Применение биомониторинга

для оценки характера и тяжести воздействия химического фактора // Медицина труда и промышленная экология. — 2010. — № 12. — С. 28–33.

5. The Environmental health criteria 215. Vinyl Chloride. — Geneva: International Programme on Chemical Safety, 1999. — 331 p.
6. Draminski W., Trojanowska B. Chromatographic determination of thiodiglycolic acid — a metabolite of vinyl chloride // Arch. Toxicol. — 1981. — Vol. 48. — P. 289–292.
7. Chen Z.Y., Gu X.R., Cui M.Z., Zhu X.X. Sensitive flame-photometric-detector analysis of thiodiglycolic acid in urine as a biological monitor of vinyl chloride // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 1983. — Vol. 82. — P. 281–284.
8. Müller G., Norpoth K., Wickramasinghe R. H. An analytical method using GC-MS for the quantitative determination of urinary thiodiglycolic acid // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 1979. — Vol. 44. — P. 185–191.
9. Tsun-Jen C., Yu-fang H., Yee-Chung M. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer exposed polyvinyl chloride workers // J. Occup. Environ. — Med. 2001. — Vol. 43, N 11. — P. 934–938.
10. Müller G., Norpoth K., Kusters E. Determination of thiodiglycolic acid in urine specimens of vinyl chloride exposed workers // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 1978. — Vol. 41. — P. 199–205.

Сведения об авторах

Журба Ольга Михайловна — кандидат биологических наук, и.о. заведующей лабораторией физико-химических методов исследования Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН — НИИ медицины труда и экологии человека (665827, Иркутская обл., г. Ангарск, а/я 1170; тел. 8 (3955) 55-40-88; e-mail: labchem99@gmail.com)

Алексеевко Антон Николаевич — младший научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН — НИИ медицины труда и экологии человека (тел.: 8 (3955) 55-40-88; e-mail: alexeeenko85@mail.ru)